

⑩ 日本国特許庁 (JP) ⑪ 特許出願公開  
 ⑫ 公開特許公報 (A) 昭61-12630

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>  
 A 61 K 39/395

識別記号 庁内整理番号  
 7043-4C

⑭ 公開 昭和61年(1986)1月21日

審査請求 未請求 発明の数 6 (全25頁)

⑮ 発明の名称 免疫毒素およびその製造法

⑯ 特 願 昭60-135215

⑰ 出 願 昭60(1985)6月20日

優先権主張 ⑱ 1984年6月20日 ⑲ フランス (FR) ⑳ 8409703

㉑ 発 明 者 フランツ・ジャンセン フランス国, 34160 カストリエ, アツサ, シュマン・  
 デ・プレスケ (番地無し)

㉒ 発 明 者 ビエール・グロ フランス国, 34100 モンペリエ, リュ・デ・ムーリエ 1  
 8

㉓ 出 願 人 サ ノ フ イ フランス国, 75008 パリ, アブニユ・ジョルジュ・サン  
 クエム 40

㉔ 代 理 人 弁理士 鈴江 武彦 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

免疫毒素およびその製造法

2. 特許請求の範囲

(1) リシンの A 鎖と抗体をカップリングさせて得られる次の一般式を有する免疫毒素。



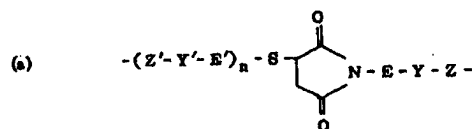
(上式中、P' は抗体または抗体の断片であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。A' はリシンの A 鎖であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。W は、チオエーテル基またはジスルフィド基を含む 2 個の共有結合構造を示す。この場合ジスルフィド基においては、両イオウ原子は P および A のシステインのそれか、または両イオウ原子は P および A 若しくはそのいずれかに属する原子団に結合している。この後者の場合、両イオウ原子は P および A 若しくはそのいずれかに属する前記原子団に結合している官能基を有する分子が介在して前記原

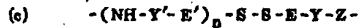
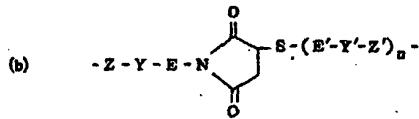
子団と結合している。但し、W がジスルフィド基を含む場合、前記ジスルフィド基のイオウ原子の 1 つが A のシステインのうちの 1 つに属するものであるときは、他方のイオウはアミノ基以外のタンパク P の基に結合した官能基を有する介在分子によりタンパク P に結合している。)

(2) リシンの A 鎖と抗体 P とをカップリングさせて得られる次の一般式を有する免疫毒素。

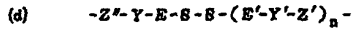


(上式中、P' は抗体または抗体の断片であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。A' はリシンの A 鎖であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。W' は次の群から選ばれる共有結合構造を示す。

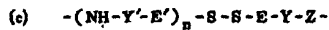




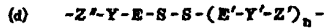
または



(上式中、ZおよびZ'はタンパクAおよびPに属する原子団を示し、1つのチロシン残基の水酸基に由来する酸素原子、AおよびPのグルタミン酸およびアスパラギン酸またはそのいずれかの末端ないし遊離カルボキシル基の1つに由来のカルボニル基、Pの糖鎖を過ヨウ素酸で酸化したあと得られるジアルデヒド構造に由来の基、および1つのリシン残基のε位のアミンの1つ若しくはAおよびPの末端アミンの1つに由来の-NH-基から選ばれる。Z'は上記のZおよびZ'と同じであるが、-NH-ではあり得ない。YおよびY'はタンパクPおよびAのZ、Z'および



または

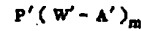


(上式中、ZおよびZ'はタンパクAおよびPに属する原子団を示し、1つのチロシン残基の水酸基に由来する酸素原子、AおよびPのグルタミン酸およびアスパラギン酸またはそのいずれかの末端ないし遊離カルボキシル基の1つに由来のカルボニル基、Pの糖鎖を過ヨウ素酸で酸化したあと得られるジアルデヒド構造に由来の基、および1つのリシン残基のε位のアミンの1つ若しくはAおよびPの末端アミンの1つに由来の-NH-基から選ばれる。Z'は上記のZおよびZ'と同じであるが、-NH-ではあり得ない。YおよびY'はタンパクPおよびAのZ、Z'およびZ'のいずれか1つと共有結合し得る官能基を示す。EおよびE'は不活性な介在分子を示す。そして、nは0または1である。))。

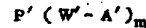
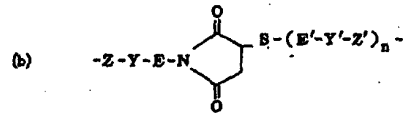
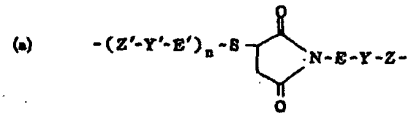
(4) 次の一般式で表わされる特許請求の範囲第3項記載の免疫毒素。

Z'基のいずれか1つと共有結合し得る官能基を示す。EおよびE'は不活性な介在分子を示す。そして、nは0または1である。))

(3) 抗体PをリシンのA鎖でカップリングして得られる次の一般式を有する免疫毒素。

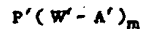


(上式中、mは0.3ないし1.2の数値を示す。P'は抗体または抗体の断片であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。A'はリシンのA鎖であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。W'は次の群から選ばれる共有結合構造を示す。



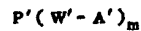
(上式中、W'およびA'は特許請求の範囲第3項記載の通りであり、P'は抗体断片FabまたはFab'を示し、およびmは0.3ないし2の範囲の数値を示す。)

(5) 次の一般式で表わされる特許請求の範囲第3項記載の免疫毒素。



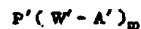
(上式中、W'およびA'は特許請求の範囲第3項記載の通りであり、P'は抗体断片P(ab)<sub>2</sub>を示し、およびmは0.5ないし4の範囲の数値を示す。)

(6) 次の一般式で表わされる特許請求の範囲第3項記載の免疫毒素。



(上式中、W'およびA'は特許請求の範囲第3項記載の通りであり、P'はIgM型の抗体を示し、およびmは0.5ないし6の範囲の数値を示す。)

(7) 次の一般式で表わされる特許請求の範囲第3項記載の免疫毒素。



(上式中、WおよびA'は特許請求の範囲第3項記載の通りであり、P'はIgM型の抗体を示し、およびmは1ないし12の範囲の数を示す。)

(8) 一般式



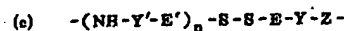
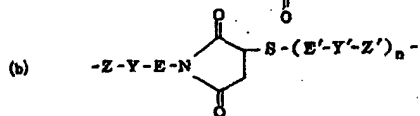
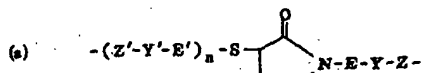
[上式中、P'は抗体または抗体の断片であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。A'はリシンのA鎖であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。Wは、チオエーテル基またはジスルフィド基を含む2価の共有結合構造を示す。この場合ジスルフィド基においては、両イオウ原子はPおよびAのシステインのそれか、または両イオウ原子はPおよびA若しくはそのいずれかに属する原子団に結合している。この後者の場合、両イオウ原子はPおよびA若しくはそのいずれかに属する前記原子団に結合している官能基を有する分子が介在して前記原子団と結合している。但し、Wがジスルフィド基を有する場合、前記ジスルフィド基のイオウ

原子の1方がリシンA鎖のシステインに属するものであるとき、他方のイオウ原子はアミノ基以外のタンパクPの基に結合した官能基を有する介在分子によりタンパクPに結合したものである]で示される免疫毒素の製造方法であって、直接または介在基を介して結合した少なくとも1つの遊離チオール基を有するタンパクであって場合に依りて修飾されているリシンのA鎖または抗体または抗体の断片であるものP<sub>1</sub>を、タンパクP<sub>1</sub>の遊離チオールと結合してチオエーテルまたはジスルフィド結合を形成し得る原子団を有する、タンパクP<sub>1</sub>とは異なるタンパクであってリシンのA鎖または抗体または抗体の断片であるものP<sub>2</sub>と、室温にて水溶液中で反応させることを特徴とする免疫毒素の製造方法。但し、ジスルフィド結合が形成される場合にタンパクP<sub>1</sub>がリシンのA鎖であるときは、該ジスルフィド結合はアミノ基以外の前記タンパクP<sub>2</sub>の基との間に形成される。

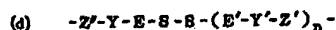
(9) 一般式で表される免疫毒素を製造する方法



[上式中、P'は抗体または抗体の断片であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。A'はリシンのA鎖であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。Wは次の群から選ばれる共有結合構造を示す。

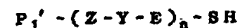


または

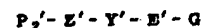


(上式中、ZおよびZ'はタンパクAおよびPに属する原子団を示し、1つのチロシン残基の水

酸基に由来する酸素原子、AおよびPのグルタミン酸およびアスパラギン酸またはそのいずれかの末端ないし遊離カルボキシル基の1つに由来のカルボニル基、Pの糖鎖を通りウレア酸で酸化したあと得られるシアラヒド構造に由来の基、および1つのリシン残基のε位のアミンの1つ若しくはAおよびPの末端アミンの1つに由来の-NH-基から選ばれる。Z'は上記のZおよびZ'と同じであるが、-NH-ではあり得ない。YおよびY'はタンパクPおよびAのZ、Z'およびZ'基のいずれか1つと共有結合し得る官能基を示す。EおよびE'は不活性な介在分子を示す。そして、nは0または1である。)で示される免疫毒素の製造方法であって式

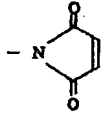


で示されるタンパクを次の一般式のタンパクと室温にて水溶液中で反応させることを特徴とする免疫毒素の製造方法。



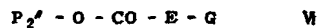
(上式中、P<sub>1</sub>'およびP<sub>2</sub>'はP<sub>1</sub>およびP<sub>2</sub>の原子

団であって前記タンパクに属する基に結合している、または抗体若しくは抗体断片の糖鎖を過ヨウ素酸との反応により開裂して得られるタンパク  $P_1$  または  $P_2$  の1つの原子団である。また  $Z$ 、 $Z'$ 、 $Y$ 、 $Y'$ 、 $E$  および  $E'$  は上記のとおりであり、 $G$  は次の基を示す。



または  $G$  は  $-S-S-X$  基 ( $X$  は活性基) である。 $G$  が  $-S-S-X$  基であり、 $P_1'$  がリシンの  $A$  鎖である場合、 $n$  は1であるが0であることもある。しかしこの場合  $Z'$  は  $-NH-$  以外である。)]

(d) 以下の一般式で表わされる生成物。



[上式中、 $P_2'$  は次の(a)、(b)から選ばれたタンパクのラジカルを示す。

(a) 抗体または抗体断片、免疫グロブリンまたは免疫グロブリン断片、または官能基のどれか1つを人工的に修飾させることによりこれら

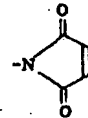
の分子から由来する分子。

(b) リシンの  $A$  鎖または官能基のどれか1つを人工的に修飾させることによりこれらの分子から由来する分子。前記タンパクの一部から除かれたチロシンのフェノール性水酸基の1つ以上は上記ラジカルから除去されている。

・酸素原子は、タンパクのラジカル  $P_2'$  から欠失するフェノール性水酸基に属するもの。

・ $E$  は不活性介在分子を示す。および

・ $G$  は



または  $-S-S-X$  ( $X$  は活性基) を示す。]

## 2. 発明の詳細な説明

### 〔産業上の利用分野〕

この発明は新規な細胞毒性包含体、その製造方法および細胞毒性作用のある組成物に関する。

### 〔従来の技術とその問題点〕

米国特許第4,340,535号には、制癌剤の

製造法が記載されているが、それはリシンの  $A$  鎖とタンパクとが共有結合により結合されて得られる包含体あるいは免疫毒素と呼ばれている。そのタンパクは、例えば抗体すなわち免疫グロブリンまたは免疫グロブリン断片であり、それらは標的となる癌細胞のような細胞の表面にある特定の抗原を特異的に認識することができる。これらの包含体の主要な特徴は、それらが標的細胞に対して特異的な細胞毒性を発揮するということである。ハプテンまたは様々な抗原または癌細胞関連抗原に対する抗体を使用することによって標的細胞に対する顕著な特異性と大きな細胞毒性を有する包含体を製造することはすでに公知となっている。これは上記の特許において明らかである。これらの特性をもった包含体としては人工的に結合させた分子があった。それは、リシンの  $A$  鎖がジスルフィド型の共有結合により抗体すなわち免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの断片と結合しており、それらは標的となる癌細胞のような細胞の表面にある

特定の抗原を特異的に認識することができる。上記の特許に記載されている包含体の特徴は、次の三つの性質が同時に備わっているということである。

(1) リシンの  $A$  鎖と抗体との間の共有結合がジスルフィド結合である。

(2) ジスルフィド結合を形成しているイオウ原子の1つは常にリシンの  $A$  鎖の257番目にあるシステイン残基のイオウ原子である。

(3) リシンの  $A$  鎖と抗体とを結びつける結合手は抗体ペプチド鎖の  $NH_2$  末端に固定されている。

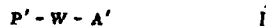
ところが、この種の抗癌剤の特徴である特異的な細胞毒性を有する包含体を得るために、必ずしも上記の条件が同時に満たされる必要がないことが今や明らかとなった。

### 〔問題点を解決するための手段〕

この発明は免疫毒素の部類に属する生成物に関する。それは、一方がリシンの  $A$  鎖それ自体または適当に修飾したもの(以後  $A$  と称す)他

方が抗体または抗体の断片それ自体または適当に修飾したもの（以後Pと称す）を共有結合させて得られる。後者は標的細胞が担っている抗原を特異的に認識し得る。2つのタンパクはジスルフィド結合またはチオエーテル結合により結合されている。

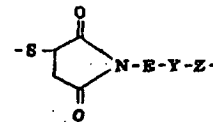
一つの観点に立つと、この発明は抗体PとリシンのサブユニットAを結合させて形成される免疫毒素に関する。それは次の一般式で示される。



上式中、P'は抗体または抗体の断片であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。すなわちタンパクの様々な基の少なくとも1つが除かれたり、他の官能基が任意に保護されている。A'はリシンのA鎖であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。すなわちタンパクの様々な基の少なくとも1つが除かれたり、他の官能基が任意に保護されている。Wは、チオ

エーテル基またはジスルフィド基を含む2価の共有結合構造を示す。この場合ジスルフィド基においては、両イオウ原子はPおよびAのシステインのそれか、または両イオウ原子はPおよびA若しくはそのいずれかに属する原子団に結合している。この後者の場合、両イオウ原子はPおよびA若しくはそのいずれかに属する前記原子団に結合している官能基を有する分子が介在して前記原子団と結合している。但し、Wがジスルフィド基を含む場合、前記ジスルフィド基のイオウ原子の1つがAのシステインのうちの1つに属するものであるときは、他方のイオウはアミノ基以外のタンパクPの基に結合した官能基を有する介在分子によりタンパクPに結合している。

2つのタンパク間のチオエーテル結合は、次の型である。

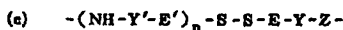
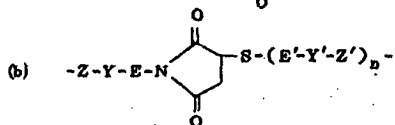
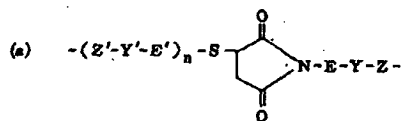


上式中のZ、YおよびEは以下に定義する。

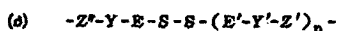
この発明は特に次の一般式の免疫毒素に関する。



上式中のP'およびA'は上記のとおりである。W'は次の群から選ばれる共有結合構造を示す。



または



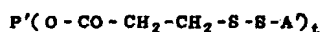
上式中、ZおよびZ'はタンパクAおよびPに属する原子団を示し、1つのチロシン残基の水酸基に由来する酸素原子、AおよびPのグルタミ

ン酸およびアスパラギン酸またはそのいずれかの末端ないし遊離カルボキシル基の1つに由来のカルボニル基、Pの糖鎖を過ヨウ素酸で酸化したあと得られるジアルデヒド構造に由来の基、および1つのリシン残基のα位のアミンの1つ若しくはAおよびPの末端アミンの1つに由来の-NH-基から選ばれる。Z'は上記のZおよびZ'と同じであるが、-NH-ではあり得ない。YおよびY'はタンパクPおよびAのZ、Z'およびZ'基のいずれか1つと共有結合し得る官能基を示す。EおよびE'は不活性な介在分子を示す。そして、nは0または1である。

この発明の免疫毒素は上記の一般式IおよびIIにより簡略された型で示されるが、2価の共有結合構造-W'-または-W'-は、少なくとも1つのP分子および少なくとも1つのA分子に結合している。タンパクPおよびAとの結合数は、結合過程に関与する前記タンパクに属する原子団の数に応じて異なる。

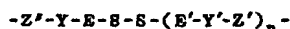
例えば、免疫毒素がジスルフィド基を有する

2価の共有結合を介して天然リシンのA鎖と抗体P（例えば、T101抗体）との結合により形成されるならば（この場合、ジスルフィド基のイオウの一方はリシンA鎖の257目のシステインに属するものであり、もう一方はオキソプロピル基によって抗体Pのチロシン残基のフェノール基の酸素に結合している）、その一般式は次のようになる。



上式中、tは結合に関与する抗体（例えば、T101抗体）中のチロシン残基の数を示す。

この結果得られる免疫毒素は、一般式Ⅱに相当する化合物であって一般式Ⅱにおいて以下の定義を有するものである。すなわちP'は上記のとおりであるが、特にチロシン残基のフェノール基が除かれたT101抗体の原子団を指す。Aも上記のとおりであるが、特に257番目のシステイン残基のチオール基が除かれたリシンのA鎖の原子団を指す。そしてW'は基(c)すなわち



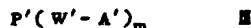
り得る。F(ab')<sub>2</sub>が用いられると、mは0.3から約2の間になり得る。またIgG型の抗体では、mの値は0.5ないし6となる。最後に、IgM抗体の場合、mの値は1ないし12の数を取り得る。しかし抗体Pの置換の程度は、mの値が0.5以上、10以下となるようなものにするのが好ましい。

また、すでに説明したように構造ⅠおよびⅡは簡略化した型で記された統計的一般式である。同様に、以下の一般式Ⅳ、ⅤおよびⅥも統計的一般式である（nが1であるときは）。というのも結合性反応体は、タンパクP<sub>1</sub>およびP<sub>2</sub>の群から調製されるからである。そのP<sub>1</sub>およびP<sub>2</sub>は、これら自体が抗体PまたはリシンのA鎖のいずれであろうと、抗体Pに関して上記で考慮した特徴と全く同一の特徴を有する。

もう一方の観点に立つと、この発明は上記構造式Ⅰを有する免疫毒素の製造法に関する。この方法において、直接または介在基を介して結合した少なくとも1つの遊離チオール基を有す

である。この式中、Z'は結合に関与するフェノール性水酸基の酸素を示し、Yは-CO-、Eは不活性介在分子-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-であり、nは0である。

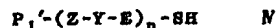
特に好ましくは、リシンのA鎖および抗体単分子Pに含まれる1つ以上の構造により形成される免疫毒素が挙げられる。それは次の一般式で示される。



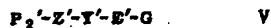
上式中、P'、W'およびA'は上記のとおりであり、mは結合に関与するタンパクPに属する原子団の数を示す。mの数は0.3ないし12であるが、0.5から10が好ましい。「mの数が0.3ないし12であるが、0.5から10が好ましい」という表現は、結合が抗体分子の集団内で均一に生じないため、mの値が統計的な値であるという意味である。したがってmの数は整数でなくともよい。特にmの値は使用される抗体に依存し、さらに詳しくはその分子量に依存する。抗体断片FabまたはFab'が出発抗体Pとして使われるとなると、mの値は0.3から約2の間とな

るタンパクP<sub>1</sub>（場合に応じて修飾されているリシンのA鎖または抗体または抗体の断片）を、タンパクP<sub>1</sub>の遊離チオールと結合してチオールエーテルまたはジスルフィド結合を形成し得る原子団を有する、タンパクP<sub>1</sub>とは異なるタンパクP<sub>2</sub>（リシンのA鎖または抗体または抗体の断片）と、室温にて水溶液中で反応させる。但し、ジスルフィド結合が形成される場合にタンパクP<sub>1</sub>がリシンのA鎖であるときは、ジスルフィド結合はアミノ基以外の前記タンパクP<sub>2</sub>の基との間に形成される。

更に、この発明は好ましくは構造式Ⅱを有する免疫毒素の製造法に関する。ここでは、P'、W'およびA'は上記のとおりである。この方法においては、次の一般式

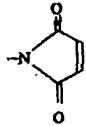


で示されるタンパクを次の一般式のタンパクと室温にて水溶液中で反応させる。



上式中、P<sub>1</sub>'およびP<sub>2</sub>'はP<sub>1</sub>およびP<sub>2</sub>の原子団

であって前記タンパクに属する基に結合している、または抗体若しくは抗体断片の糖鎖を過ヨウ素酸との反応により開裂して得られるタンパク  $P_1$  または  $P_2$  の1つの原子団である。また  $Z$ 、 $Z'$ 、 $Y$ 、 $Y'$ 、 $E$  および  $E'$  は上記のとおりであり、 $G$  は次の基を示す。



または  $G$  は  $-S-S-X$  基 ( $X$  は活性基) である。 $G$  が  $-S-S-X$  基であり、 $P_1'$  がリシンの  $A$  鎖である場合、 $n$  は1であるが0であることもある。しかしこの場合  $Z'$  は  $-NH-$  以外である。

従って、 $P$  および  $A$  双方は、次の基のいずれかを有する。

- (1) 結合に関与する1個以上のチオール基、および
- (2) 上記チオール基と反応してジスルフィドまたはチオエーテル結合を形成し得る1つ以上

飾して  $A$  鎖から由来するいかなる分子をも示す。但し、無細胞系において証明できるように、これらのタンパクは真核細胞においてリボソームのタンパク合成を阻害するという性質をなお有するものである。

記号  $P'$  は、上記タンパク  $P$  それ自体またはそれを適宜化学的に修飾したものから得られるラジカルを示す。化学修飾タンパクには、それからそれ自体の基の1つ以上が除かれたもの、またそれに他の官能基が任意に保護されているものが含まれる。

記号  $A'$  は、上記タンパク  $A$  それ自体またはそれを適宜化学的に修飾したものから得られるラジカルを示す。化学修飾タンパクにはそれからそれ自体の基の1つ以上が除かれたもの、またそれに他の官能基が任意に保護されているものが含まれる。

記号  $P_1$  は、上記のタンパク  $A$  および  $P$  の1つを示す。それは、直接かまたは介在分子を経て上記タンパクに結合している遊離チオール基を

の官能基。この発明では、記号チオール基および官能基は天然のタンパク  $P$  または  $A$  のものであるか、または人工的に修飾されたものである。

以下に上記のタンパクまたはその原子団を扱うために使われる記号の意味および様々な記号を扱うのに使われる表現の意味するところを記載して、内容を明確にしておく。記号  $P$  は、いかなる抗体または抗体の断片すなわちいかなる免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの断片、またはいかなる分子であってその官能基のいずれか1つを人工的に修飾して得られるものをも示す。官能基としてはそれらタンパクに付いている糖鎖構造を含む。但し、修飾されたタンパクは、細胞とりわけ癌細胞の表面に存在する特定抗原をなを特異的に認識し得るものでなければならぬ。

記号  $A$  はタンパクであるが、植物毒素の  $A$  鎖と称されるサブユニットである。それは天然のリシンから直接得ることもできるし、このタンパクに付いているいかなる官能基を人工的に修

有する。

記号  $P_2$  は、 $P_1$  とは異なり、上記のタンパク  $A$  および  $P$  の1つを示す。それは、上記遊離チオール基と結合し得る1つ以上の官能基を有する。

記号  $P_1'$  は、タンパク  $P_1$  に属する原子団、特に  $SH$  基 (システインの)、 $NH_2$  基 (タンパクの末端またはリシンの  $\epsilon$  位)、 $OH$  基 (チロシンの) または  $COOH$  基 (アスパラギン酸およびグルタミン酸の) に結合した、 $P_1$  のラジカルを示す。または  $P_1'$  は、 $P_1$  が抗体または抗体断片である場合、過ヨウ素酸との反応により糖鎖を開裂することによって得られるタンパク  $P_1$  のラジカルを示す。

記号  $P_2'$  は、特徴的な官能基  $NH_2$  (タンパクの末端またはリシンの  $\epsilon$  位)、 $OH$  (チロシン) または  $COOH$  (アスパラギン酸およびグルタミン酸) に結合している、タンパク  $P_2$  のラジカルを示す。

例を挙げると、 $P_1'-SH$  は、システインの  $SH$  基がそのまま他の官能基が場合に依じて保護

されているタンパク  $P_1$  (抗体または抗体断片  $P$  またはリシンのA鎖)を示す。

同様に、 $P_1$ -CO- は、末端カルボキシル基、またはそのグルタミン酸およびアスパラギン酸のカルボキシル基がSH基を人工的に導入する基と結合されたタンパク  $P_1$ を示す。

更に  $P_2$ -NH- は、末端アミノ基またはリシンのアミノ基がタンパク  $P_1$  のチオール基と結合し得る基に付いているタンパク  $P_2$  (抗体または抗体断片  $P$  またはリシンのA鎖)を示す。

ZおよびZ'に関して用いられている「不活性介在分子」という用語は、この発明の方法に用いられる反応体に対して不活性な2個の有機原子団を示す。例えば、炭素数1から15の直鎖または分枝アルキレン基が挙げられる。これらは1つ以上の二重結合を有してもよいし、酸素原子が介在してもよい。またはメチル基、遊離若しくはエステル化されたカルボキシル基、ジアルキル基またはカルバメート基のような1つ以上の不活性官能基によって置換されていても

よい。同じ用語は炭素数6から15のアリーレン基も示す。これはアルキレン基について上に述べたような1つ以上の不活性官能基で置換されていてもよい。

YおよびY'に関して用いられている「共有結合し得る官能基」という用語は、タンパク  $P_1$  および  $P_2$  に属する基と反応して共有結合を形成し得る原子団(基)を指す。例えば、-CO- 基および  $-(C=NH)-$  基は、タンパクの遊離アミン、チオールおよびフェノール性水酸基と反応し得る官能基とに連している。同様に -NH- 基は、 $P_1$  または  $P_2$  が抗体または抗体断片のとき、過ヨウ素酸で酸化した後タンパク  $P_1$  または  $P_2$  の鎖構造の2つの炭素原子と結合し得る官能基として連している。

「タンパクに属する原子団」という用語は、ここではZ、Z'およびZ''に関して用いられているが、タンパク  $P_1$  および  $P_2$  を形成しているアミノ酸の特徴的な原子団に由来する原子団のことを指す。例えばチロシンおよびセリンの水酸

基由来の酸素原子、アスパラギン酸、およびグルタミン酸の末端カルボキシル基すなわち遊離カルボキシル基由来のカルボニル基、タンパクの末端アミノ基またはリシンのアミノ基由来の-NH- 基、またはシステインのチオール基由来のイオウ原子が挙げられる。同じ用語は、 $P_1$  または  $P_2$  が抗体または抗体断片の場合、過ヨウ素酸処理によりタンパク  $P_1$  または  $P_2$  の鎖の1つを酸化したのち得られるジアルデヒド構造由来の基をも指す。

「活性ラジカル」という言葉は、ここではXに関して使われているが、-S-S- 架橋に結合した基であって、遊離チオール基と反応して<sup>13</sup>X-SHを放出しジスルフィド結合を形成し得る基を指す。活性基としては、ビリジン-2-イルおよびビリジン-4-イルが適しており、それらは1つ以上のハロゲンまたはアルキル、カルボキシルまたはアルコキシカルボニル基で置換されているか置換されていない基である。またフェニル基も適しており、それは、置換されてい

くともよいが好ましくは、1つ以上のハロゲンまたはニトロ、アルコキシ、カルボキシル若しくはアルコキシカルボニル基で置換される。更にメトキシカルボニルのようなアルコキシカルボニル基も適している。

「アルキル」および「アルコキシ」という語は炭素数5以下のものを言う。

「アルキレン」という語は、炭素数10までの直鎖または分枝の飽和脂肪族基を指すが、それらはアルコキシカルボニル基のような1つ以上の不活性官能基によって置換され得る。

純粋なリシンのA鎖の製造は、この発明の生成物を得るために必要であるが、米国特許第4,340,535に記載されている。ヒト癌細胞を標的としたモノクローナル抗体の製造法は科学文献に広く記載されており、今やこれらの多くは市販品として手に入る。

抗体(または抗体断片)とリシンのA鎖との化学的結合はこの発明の方法により実施でき、この方法は次の特徴を有する。



(1) 包合体の2つの成分すなわち抗体とリシンのA鎖の各生物学的活性を保持する。

(2) この方法で充分な再現性が得られ、また高い収率が保証される。

(3) 得られる包合体中のリシンA鎖と抗体の比の値を調節することを可能にする。

(4) 安定で水溶性の生成物が調製できる。

これらの特徴を有する工程の中で2つのタンパクを結合させるために1つ以上のチオール基が関与するものが好ましい。事実、これらのチオール基は、ジスルフィド結合またはチオエーテル結合を形成させるために特に適している。これらの双方は上記の一般的条件を充す。

一般に、タンパク間の結合を成功させ、特に無秩序な架橋を生じさせないために、結合させる一方のタンパクにだけにひとつまたはひとつ以上のチオール基を導入することが重要である。他方のタンパクは、 $\text{pH}$  5ないし9の水性溶液中で30℃を越えない温度にてチオール基と反応して安定な共有結合を形成し得る1つ以上の基

を備えているだけである。出発質として使用するタンパク $P_1$ および $P_2$ の特徴は以下で詳細に記載する。介在分子Eは好ましい分子Rから $R_2$ と置換させることができる。これは実施例に述べる。

#### 1. タンパク $P_1$

このタンパクは、どんな場合も結合に関与する1つか1つ以上のチオール基を有しているもので、生じる状況はタンパク $P_1$ の性質に応じて異なる。

(A) 天然の状態でタンパク $P_1$ は、タンパク $P_2$ との結合に関与する1つ以上のチオール基を有している。このことは特に次のような場合に言える。すなわち、タンパク $P_1$ が、ペプシンの存在下で抗体を限定分解し、続いて高分子間のジスルフィド結合を還元して通常得られるような $F(ab)'$ として知られる抗体断片である場合である。このことは、タンパク $P_1$ がリシンのA鎖またはA鎖の誘導体である場合にもあてはまる。この場合、天然リシンの171番目のシステ

ン残基および257番目のシステイン残基に付いている少なくとも1つのチオール基が未結合であって化学結合を生じやすい。これらすべての場合において、天然のチオール基を有するタンパク $P_1$ はこのような状態で結合工程に使用される。

(B) 天然の状態でタンパク $P_1$ は、タンパク $P_2$ との結合に関与するチオール基を有していない。このことは特に次のような場合に言える。すなわち、タンパク $P_1$ が天然の免疫グロブリンであって、抗体全体か抗体の断片特に通常 $F(ab)'$ または $F(ab)$ と呼ばれる断片の1つである場合。天然の状態でタンパク $P_1$ が結合に関与する1つのチオール基を持たない場合のいま1つの例は、このタンパク $P_1$ が、2つのシステイン残基それぞれがアルキル化により保護されているか、または化学修飾を受けないリシンのA鎖である場合である。全ての場合において、結合を可能にする1つ以上のチオール基をそのような分子に導入することが妥当といえる。

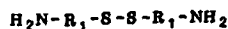
3つの型の反応がチオール基を導入するために好ましく用いられる。

(1) 最初の型の反応は、S-アセチルメルカプトコハク酸無水物との反応である。この酸無水物は、タンパクのアミノ基のアセチル化を可能にする。その後当該チオール基をヒドロキシアミンと反応させることによってアセチル保護基を除くことができる。この方法はすでにアーサーズ・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジクス(Archives of Biochemistry and Biophysics)、119、41-49(1967)に記載されている。このように保護基が導入されたチオール基を続いて活性型ジスルフィド基と反応させる場合、ヒドロキシアミンによって前もって保護基をはずさなくて済む可能性がある。事実、この発明の物質を形成する反応体を使ってジスルフィド結合を形成する反応は、遊離チオール基を使った場合と同様にS-アセチル基を使っても生じる。

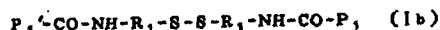
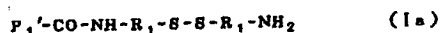
文献に記載されている他の方法も、修飾され

るタンパクにチオール基を導入するために使うことができる。

(2) 第2の型の反応はタンパクをカルボキシ基を介して以下に示すジスルフィド 造を有する対称的なジアミノ分子と反応させることである。

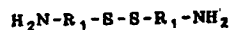


上式中、 $\text{R}_1$  は炭素数2から5の脂肪族原子団である。この反応では、カルボジイミド特に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-カルボジイミドのような水溶性の誘導体の如きカップリング剤の存在下でシスタミン [ $\text{R}_1=-(\text{CH}_2)_2-$ ] と反応させ、用いた化学量論量に応じて次に示す誘導体の1つか双方の混合物を形成させることが好ましい。



この型の反応生成物は次の2つの工程のいずれかに供される。

を使うことである。この糖鎖単位は天然の状態で抗体に存在しているものである。続いてタンパクは、糖鎖単位にアルデヒド基を生じさせるために過ヨウ素酸で酸化される。過剰のエチレングリコールを加えて反応を停止させ、副産物と過剰の反応体を透析により除いた後、得られた生成物を次の一般式を有対称なジアミノ分子で処理する。



上式中、 $\text{R}_1$  は炭素数2ないし5の脂肪族量である。得られた付加生成物は、続いて金属水素化物（特に、水素化ホウ素ナトリウム）との反応により第2または第3アミンに還元される。この反応はシスタミン [ $\text{R}_1=-(\text{CH}_2)_2-$ ] を用いて実施することが好ましく、用いた化学量論量に応じて次式の誘導体の1方かその双方の混合物が形成される。

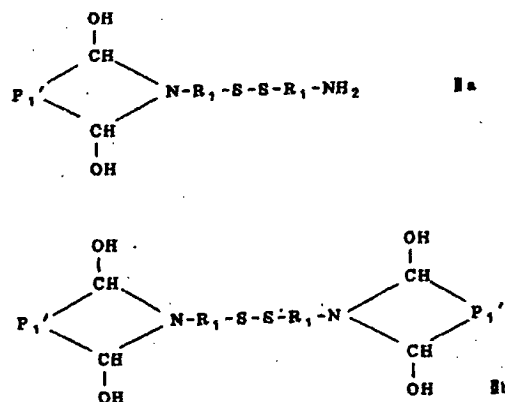
(a) 式 Ia または Ib において、タンパク  $\text{P}_1$  がリシンのA鎖またはその誘導体の1種ならば、得られた反応溶液は分別せずに2-メルカプトエタノールのような還元剤との反応に供せられる。それによって次式の1種類のタンパク誘導体を得られる。



こうして得られた生成物は続いて透析かゲル濾過により精製される。

(b) 式 Ia および Ib において、ラジカル  $\text{P}_1'$  が抗体またはその断片の1種から成る、タンパクPのラジカルならば、得られた反応溶液はそのままカップリングに用いられ、その場合チオール/ジスルフィド交換法が用いられる。この交換法は、例えばギリランド (Gilliland) とコリエール (Collier) によってキャンサー・リサーチ (Cancer Research), 40, 3864(1980) に記載されている。

(3) 第3の反応は、導入しようとするチオールを有するラジカルを固定するために糖鎖単位



得られた反応液を、Ia または Ib の構造式で表わされる生成物であって  $\text{P}_1'$  が抗体または抗体断片であるものに関して上記したとりの処理を行なってもよい。

チオール基を人工的に導入（対称なジアミノジスルフィド反応体を使うタイプ）するための上に述べた後二者の反応において、タンパク  $\text{P}_1$  は遊離SH基または遊離アミノ基を持たないこ

とが好ましい。A鎖とその誘導体の場合には、N-エチルマレイミドまたはマロイ酸のようなチオール基に対する通常の試薬との反応により天然のチオール基をアルキル化し、およびミーネズ (MEANS) およびフィーニー (FEENEY) によってバイオケミストリー (Biochemistry) 7,2192(1968) に記載された遊元的メチル化法に従って天然のNH<sub>2</sub>基をメチル化することにより常に遊離のチオール基を持たなくさせ得る。このようにして天然リシンのA鎖に1モル当り6個までのメチル基を導入することができる。このようにして修飾されたタンパクには、生物学的な特性(特に、真核細胞のリボソームにおけるタンパク合成を阻害する能力)が備わっている。抗体または抗体断片さらに第1群のすべての物質の場合には、前記したようにそれらは天然の遊離SH基を持たないので、遊元的メチル化を例えばミーネズおよびフィーニーの方法により実施するほうがよい。このようにして通常抗体1モル当り数十のメチル基を導入するこ

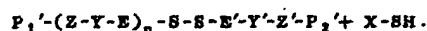
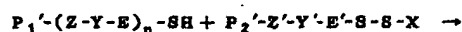
とができる。その場合抗体の細胞膜面上の抗原を認識する能力を変化させない。

## II タンパク P<sub>2</sub>

あらゆる場合、このタンパクは、タンパク P<sub>1</sub> のチオール基と反応してジスルフィドまたはチオエーテル結合を形成し得る1つ以上の官能基を有するタンパクである。これらの官能基は、常にタンパク P<sub>2</sub> に人工的に導入されるが、それがジスルフィド結合によりカップリングされるのかチオエーテル結合によりカップリングされるのかに応じて異なっている。具体的には以下に記載する。

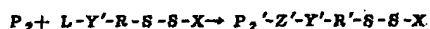
### (1) ジスルフィド結合

この場合、包含体の調製は以下の式で表わされる。



活性イオウ原子により置換されるタンパク P<sub>2</sub> は、タンパク P<sub>2</sub> または適切に保護されたタンパク

P<sub>2</sub> からそれ自体活性イオウ原子を有する試薬による置換により得られる。これは次の式で示される。



上式中、P<sub>2</sub> は置換されるべきタンパクを示し、L-Y'は試薬をタンパクに共有結合させる基を示す。官能基L-Y'は、置換されるべきタンパクの構成アミノ酸の側鎖に付いているいずれか1つの基と共有結合し得る基である。これらの基の中で、特に次のものが選出される。

(a) ペプチド鎖の末端アミノ基またはタンパクに含まれるリシン残基のアミノ基。この場合、L-Y'は特に次のように表わされる。

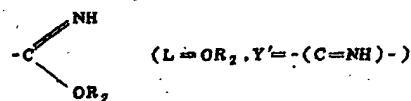
・カルボジイミド、特に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-カルボジイミドの如き水溶性誘導体のようなカップリング剤の存在下でタンパクのアミノ基と結合し得るカルボキシル基。

・アミノ基と直接反応して、それをアシル化し得るカルボン酸塩化物。

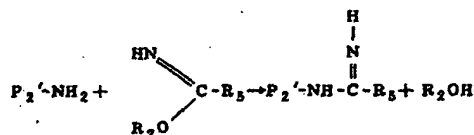
・オルト-またはパラ-ニトロフェニルまたは-ジニトロフェニルエステル、またはN-ヒドロキシコハク酸イミドエステルのようないわゆる「活性型」エステル。これはアミノ基と直接反応して、それをアシル化し得る。

・コハク酸無水物のようなジカルボン酸の内部分無水物。これはアミノ基と自然に反応して、アミド結合を形成させる。または

・イミドエステル基



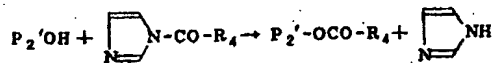
上式中、R<sub>2</sub> はアルキル基で、次式のようにタンパク P<sub>2</sub> のアミノ基と反応する。



上式中、R<sub>3</sub> は -R-S-SX 基を示す。

(b) タンパクに含まれるチロシン残基のフェ

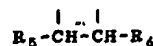
ノール基。この場合、L-Y'は特にイミダゾール-1-イルカルボニル基を示すことがある。それは次の式に従ってタンパクのフェノール基と反応する。



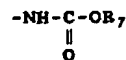
上式中、Lがイミダゾール-1-イルで、Y'がCO基で、R<sub>4</sub>が-R-S-S-X基である。-S-S-Xは遊離チオール基と反応し得る活性型ジスルフィドを示す。特に、このジスルフィドにおいて、Xは1つ以上のアルキル、ハロゲンまたはカルボキシ基で置換されていることのあるピリジン-2-イルまたはピリジン-4-イル基を指すことがある。Xもまた1つ以上のフェニル基またはカルボキシ基で好ましくは置換されているフェノール基を指すことがある。またはXはメトキシカルボニル基のようなアルコキシカルボニル基を指すこともある。

R基は、置換基Y'およびS-S-Xを同時に結合

し得る介在分子(前式中のEのような)を示す。それは、後の反応において、使用される反応物質と合成される生成物を妨害するような基を含まないようなものでなければならない。特に、R基は-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-でもあり得(nは1ないし10)、また次の基でもあり得る。



上式中、R<sub>5</sub>は水素または炭素数1ないし8のアルキル基を指し、R<sub>6</sub>は続いて使われる次式のカルカルバメイト基のような反応体に不活性な置換基を指す。



上式中、R<sub>7</sub>は炭素数1から5の直鎖または分枝アルキル基、特に第3ブチル基を示す。化合物L-Y'-R-S-S-XとタンパクP<sub>2</sub>との反応は均質な液相、最も一般的には水または緩衝液中で進行する。反応体の溶解性を高めるには、水に可溶性の有機溶媒を反応溶媒に加えることができる。

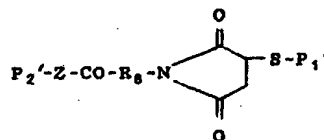
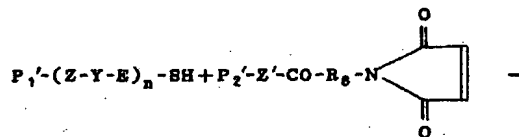
その後終濃度を、第3ブタノールのような第3アルコールの場合には容積比で20多までにすることができ、ジメチルホルムアミドまたはテトラヒドロフランの場合には容積比で10多までにすることができる。

反応を、室温にて数分から数時間の時間をかけて実施する。その後、低分子量の生成物および特に過剰の反応体を透析またはゲル濾過によって除去することができる。この方法により、タンパク1モルあたり1ないし15の置換基を導入することが可能となる。そのような化合物を用いる場合、タンパクP<sub>1</sub>とのカップリングは、pH6から8の溶液中にて30℃を越えない温度で、1時間から24時間かけておこなう。低分子量の生成物を除くために適宜、得られた水溶液を透析する。ついで包合体を既知の方法の要法により精製できる。

## (2) テオエーテル結合

この場合、包合体をP<sub>1</sub>'-(Z-Y-E)<sub>n</sub>-SHと前もって1つ以上のマレイミド基を導入しておいた

タンパクP<sub>2</sub>とを反応させることにより調製する。1例として、反応を次の式で示す。



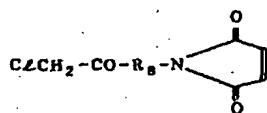
上式中、 $R_8$ は炭素数1ないし15の脂肪族または芳香族介在分子を示す。それは、就いて使用される反応体に対して不活性である。 $Z$ は、結合に關与するタンパク $P_2$ の官能基の種類に従って変化する基を示す。すなわち、 $Z$ は、酸素(チロシン残基(チロシル基)のフェノール基のエステルの場合)、 $NH$ (タンパクのアミノ基と活性型カルボキシル基のカップリングの場合)または $NH-CH_2$ (タンパクのアミノ基とクロロメチルケトンの場合)である。

マレイミドで置換されたタンパク $P_2$ は、それ自体マレイミド基を有する試薬によってタンパクの適当な基を置換することによって、タンパク $P_2$ 自体からまたは適当に保護されたタンパク $P_2$ から得られる。これらに適した基のうち、特に次のものが選ばれる。

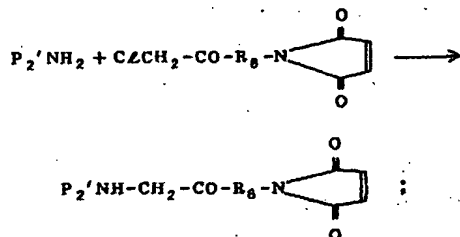
a) ペプチド鎖の末端アミノ基またはタンパクに含まれるリシン残基(リシル基)の側鎖アミノ基。この場合、マレイミド基を有する試薬は次のようなものがある。

として手に入る。

イ) 次の一般式の試薬

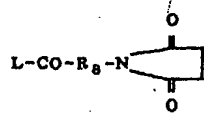


これは次の反応式に従ってタンパク $P_2$ のアミノ基と反応し得る。



b) タンパクに含まれるチロシン残基のフェノール基。この場合、マレイミド基を有する試薬は次の一般式で示される。

ア) 次の一般式の試薬

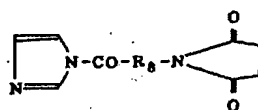


上式中、 $L-CO-$ は次のとおりである。

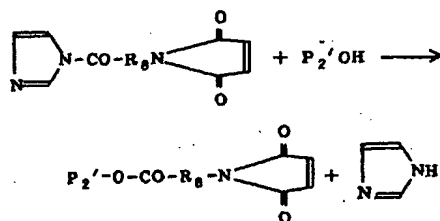
○ カルボキシル基。その場合、カルボジイミドのようなカップリング剤および特に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-カルボジイミドのような水溶性誘導体の存在下でカルボキシル基を活性化し、反応が進行する。

○ またはオルト-若しくはパラ-ニトロフェニルまたはジニトロフェニルエステルまたは $N$ -ヒドロキシコハク酸イミドエステル。

これは直接アミノ基と反応し、それをアシル化する。このような試薬の調製は、特にヘルベチカ・ケミカ・アクタ(Helvetica Chimica Acta), 58, 531-541(1975)に記載されている。同じようなクラスの他の薬剤は市販品



これは次の反応式に従ってタンパクのフェノール基と反応する。

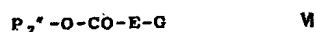


マレイミドを有する試薬とタンパク $P_2$ との反応は均質な液相、最も一般的には水または緩衝液中で進行する。反応体の溶解性を高めるには、水に可溶性の有機溶媒を反応溶液に加えることができる。その最終濃度を、第3ブタノールのような第3アルコールの場合には容量比で2.0までに行うことができ、ジメチルホルムアミ

Dまたはテトラヒドロフランの 合には容量比で10%までに行うことができる。反応は室温にて数分から数時間かけておこなう。そのような化合物を使うと、タンパクP<sub>1</sub>とのカップリングは、pH 6ないし8の水溶液中にて30°を越えない温度で1時間ないし24時間かけて、2つのタンパクを混合することによっておこなわれる。得られた標識を低分子量の生成物を除くため適宜透析し、続いて包合体を既知の様々な方法により精製できる。

この発明の化合物のうち、特に適したものとして、式Ⅱの化合物が挙げられる。その場合、Wは前記の原子団(a)、(b)、(c)および(d)の中の1つを示し、その中でEおよびE'は(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-基(pは2ないし7の整数)およびCH-CH<sub>2</sub>COOH基を示す。

また、別の観点に立つと、この発明は次の一般式を有する新規な生成物に関する。



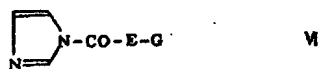
上式中、P<sub>2</sub><sup>\*</sup>は次の(a)、(b) から選ばれるタンパ

ビリジン-4-イル基；1つ以上のハロゲンまたはニトロ基、アルコキシ基、カルボキシ基若しくはアルコシカルボニル基で置換されているか置換されていないフェニル基；またはアルコシカルボニル基から選ばれる活性基である。

式Ⅱの生成物は次式の生成物とそのまた下に示すⅢ式の化合物とを反応させて得られる。



上式中、R<sub>2</sub><sup>\*</sup>は上述したとおりであり、水酸基はP<sub>2</sub><sup>\*</sup>のチロシンから欠失するフェノール性水酸基を示す。



上式中、EおよびGは上記に記したとおりである。反応は、10ないし40℃の温度でジオキサンまたはテトラヒドロフランの如きエーテル溶媒のような水に可溶性の有機溶媒を任意に含む水溶性溶媒中にて行なう。

クのラジカルを示す。

(a) 抗体または抗体断片、免疫グロブリンまたは免疫グロブリン断片、または官能基のどれか1つを人工的に修飾させることによりこれらの分子から由来する分子。

(b) リシンのA鎖または官能基のどれか1つを人工的に修飾させることによりこれらの分子から由来する分子。前記タンパクの一部から除かれたチロシンのフェノール性水酸基の1つ以上は上記ラジカルから除去されている。

○ 酸素原子は、タンパクのラジカルP<sub>2</sub><sup>\*</sup>から欠失するフェノール性水酸基に属するもの。

○ EおよびGは前記に定義したとおり。

式Ⅱで表わされる化合物が特に好ましい。この場合、その式中のEは-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-基(pは2ないし7の整数)または-CH-CH<sub>2</sub>COOH基を示す。またGは-B-B-X構造の基(Xは、1つ以上のハロゲンまたはアルキル基、カルボキシ基若しくはアルコシカルボニル基で置換されているか置換されていないビリジン-2-イルおよび

次に示す実施例により、この発明がよりはっきりと分かるであろう。しかしこの発明の範囲はこれに限定されない。すべての実施例において、記載される包合体の調製法は、米国特許第4,340,535号に記載されている方法により得られたような天然型のリシンのA鎖を用いたものである。

これら実施例では次のような抗体が使用される。

○ ヒトTリンパ球や多種ヒトTリンパ系白血病細胞上に存在する抗原T65に対するモノクローナル抗体T101。この抗体は、ジャーナル・オブ・イムノロジー (Journal of Immunology), 125(2), 725-727 (1980) に記載されている。これは、ハイブリテック社 (HYBRITTECH Inc.) (米国、カリフォルニア州、サンディエゴ) から入手できる。

○ マウスリンパ球上のThy 1.2抗原に刻するモノクローナル抗体AT15E。この抗体は、ジャーナル・オブ・イムノロジー (Journal of

Immunology), 122, 2491-2498 (1981) に記載されているものであり、ハイブリドーマ (Hybridoma), 1(1), 13-17 (1981) に記載のハイブリドーマから得られる。

○ 抗-DNPモノクローナル抗体。

〔実施例〕

実施例1

P<sub>1</sub>は、カルボキシルを介して導入されたSH基を有するリシンのA鎖。

P<sub>2</sub>はアミンを介して導入された活性型ジスルフィド基のあるT101抗体。

(A) 適切な官能基が導入されたリシンA鎖の調製

1) N-エチルマレイミドによる天然チオール基の保護

リシンA鎖の濃度8mg/mlの水溶液15ml(A鎖4.1マイクロモル)を終濃度1%となるように2-メルカプトエタノールの水溶液で処理した。その水溶液を1時間静置し、続いてpH7の125mMリン酸緩衝液に対して連続的(300ml/時の速さで4.0時間)に透析した。エルマ

(NEM)40mg(1.33マイクロモル)を溶かし、125mMリン酸緩衝液に加えた。溶液のpHを1N塩酸で5.4に調節した。反応を20℃にて2時間進行させ、続いて酢酸ナトリウムの1M水溶液750μlを添加して停止させた。そして反応溶液をpH7の125mMリン酸緩衝液で連続的(300ml/時で2.0時間)に透析して精製した。

続いてタンパクに付いているシスタミンのジスルフィド結合を、2-メルカプトエタノールで還元した(最終濃度3%, 30℃にて1時間)。続くpH7の125mMリン酸緩衝液に対しての透析は上記のとおり続けた。遠心後、修飾されたA鎖(NEM)(濃度1.75mg/ml)の溶液を得た。この生成物をエルマンの方法で測定したところタンパク1分子当りのSH基は0.7であった。濃度勾配ポリアクリルアミド電気泳動により調べたところ、この修飾されたA鎖(NEM)は、単一バンドとして現われ、分子量は約30,000であった。

ンの方法[メソッド・イン・エンザイモロジー(Method in Enzymology), 25, 457(1972)]を用いるとリシンA鎖1モル当りSHは0.9当量であった。このSH基をメソッド・イン・エンザイモロジー, 11, 541(1967)に記載の方法によりN-エチルマレイミドで保護した。この際、前段階で得られたリシンA鎖を、A鎖1モル当り20当量のN-エチルマレイミドの存在下で30℃にて2時間インキュベートした。過剰の試薬をpH7の125mMリン酸緩衝液に対して連続的(500ml/時の速さで2.0時間)に透析して除いた。この結果、リシンA鎖濃度7mg/mlの溶液13mlを得た。これには、エルマンの試薬で測定し得るチオール基はもはや存在しなかった。このようにして得られた生成物を以後A鎖(NEM)と呼ぶ。

2) カルボキシル基の修飾

シスタミン塩酸塩1.95ミリモルおよび1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-カルボジイミドの1M水溶液390mlを、A鎖

(B) 修飾抗体の調製

3-(ピリジン-2-イルジスルファニル)プロピオン酸11mgを含む水溶液を前もって第3ブタノールに溶かし、それと1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-カルボジイミド6.5mgを、T101抗体濃度10mg/mlの溶液25ml(抗体1.68ミリモル)に加えた。この混合物を30℃にて15分間撹拌し、続いてpH7.0のリン酸緩衝液に対して連続的(500ml/時で4.0時間)に透析した。透析後、タンパク溶液を遠心し、1ml当り10.3mgの修飾抗体を含む溶液24.5mlを得た。2-メルカプトエタノールとの交換反応により放出されるピリジン-2-チオンを343nmで分光分析したところ、得られた抗体は1分子当り1.7個の活性型ジスルフィド基を有することが分かった。

(C) 免疫毒素の調製

上記で得た修飾A鎖(NEM)の溶液7.5ml(0.44マイクロモル)を上記で得た活性型抗体の溶液1.75ml(0.12マイクロモル)に加え、

その混合物を30℃にて5時間インキュベートした。その溶液を遠心し、そしてセファデックスG100をつめたカラムでゲル濾過して精製した(溶出液の光学的濃度は280nmで測定した)。抗体とA鎖両方を含む面分を集めたところ、濃度0.51mg/mlの免疫毒素溶液3.1ml(15.8mg)を得た。この濃度は、1ml当り抗体とカップリングした修飾A鎖(NEM)0.125mg含んでいた。従って、この調製液のカップリングの程度は、抗体1分子当り1.6A鎖(NEM)であった。

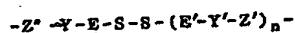
この結果、式Ⅱの免疫毒素が得られた。

この式中で、

A'は、SH基がN-エチルマレイミドで保護されたリシンのA鎖のラジカル。

P'は、T101抗体のラジカル。および、

Wは次式で示される原子団。



上式中、

- ・ Z' は -CO-
- ・ Y は -NH-
- ・ E は -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-
- ・ E' は -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-
- ・ Y' は -CO-
- ・ Z' は -NH-
- ・ n は 1。

#### D) 免疫毒素活性試験

60Sリボソームサブユニットを分解することによって、真核細胞のタンパク合成を阻害することが、リシンA鎖の基本的な生物学的特性である。従って、無細胞系(テスト-1)または有細胞系(テスト-2)でタンパク合成の阻害を調べる試験を行なった。

##### 1) 無細胞系(テスト-1)

この生体外の実験法においては、適当に改良したラット肝の細胞レベル以下の面分であって人工メッセンジャーRNA(ポリウリジル酸)の存在下で<sup>14</sup>C-フェニルアラニンを取込むことができるものを用いた。細胞レベル以下の面分

の調製のため、および<sup>14</sup>C-フェニルアラニンの取込みの測定のために使用した方法は、バイオケミカ・バイオフィジカ・アクタ(Biochemica・Biophysica・Acta), 312, 608-615(1973)に記載された方法を応用したものである。それには、ミクロソーム面分と細胞質面分の両方を用いた。A鎖を含む試料を、pH7.6の50mMトリス塩酸緩衝液(0.2%の2-メルカプトエタノールおよび15mg/mlのウシ血清アルブミンを含む)中に導入した。得られた計数を計算(阻害剤を含まない対照溶液を比較として)し、リシンA鎖を含む各反応溶液に対してタンパクへの<sup>14</sup>C-フェニルアラニンの取込みの阻害率を求めた。これらの値から、この実験条件下で<sup>14</sup>C-フェニルアラニンの取込みを50%阻害するリシンA鎖の濃度(IC<sub>50</sub>)を求めることができた。

##### 2) 有細胞系(テスト-2)

この試験では、培養細胞中への<sup>14</sup>C-ロイシンの取込みを測って、その物質の効果を調べ

た。使用した細胞は、免疫毒素を調製するために選ばれた抗体の特異性に依存した。この実施例では、通常T65抗原を有するCEMヒトリンパ芽球様の細胞を使用した。この細胞を、測定すべき物質の製剤の存在下でインキュベートした。そして、インキュベーションを終えてから、その細胞が<sup>14</sup>C-ロイシンをどの程度取込むかを調べた。この測定に使用した手法は、ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 249(1974), 3557-3562(1974)に記載の方法を応用したものである。すなわちトレーサーとして<sup>14</sup>C-ロイシンを用い、タンパク合成の程度を測定した。取込まれた放射線活性は、ここではゲル濾過で分離した完全な細胞に関して測定した。この方法に基づくと、投与量-作用曲線(横軸に被験物質の濃度を取り、縦軸に被験物質存在下で対照細胞の<sup>14</sup>C-ロイシンの取込に対するパーセントで表わした<sup>14</sup>C-ロイシンの取込みを取る)を作製することができる。このようにして、各被験物



値に対して、 $^{14}\text{C}$ -ロイシンの取込みを50パーセント阻害する濃度すなわち「50%阻害濃度」( $\text{IC}_{50}$ )を求めることができる。完全細胞の $^{14}\text{C}$ -ロイシンの取込みを測定すれば、従来のタンパク合成の測定法によって得られる結果と一致する $\text{IC}_{50}$ を決定できることも調べた。

### 3.) 結果

#### a. テスト-1(無細胞系)

修飾A鎖の阻害活性を測定した。 $\text{IC}_{50}$ は $2.18 \times 10^{-10}$ モル/ℓとなった。この実験で対照A鎖の $\text{IC}_{50}$ は $1.03 \times 10^{-10}$ モル/ℓであった。従って、修飾してもA鎖の活性はあまり減少しない。

#### b. テスト-2(有細胞系)

そのまま抗原T65を有するCEM細胞について、この試験を行なった。包合体の細胞毒性は著しかった( $\text{IC}_{50}$ は約 $10^{-9}$ モル/ℓ)。A鎖の値(同一操作条件で $\text{IC}_{50}$ は $5 \times 10^{-8}$ )より50倍高かった。10mM塩化アンモニウムの存在下では包合体の細胞毒性効果は更に増大

( $\text{IC}_{50} = 2 \times 10^{-12}$ モル/ℓ)した。このようにこの細胞毒性は、A鎖のそれよりも25,000倍高い。

#### 実施例2

$P_1$ は、カルボキシを介して導入されたSH基を有するリシンA鎖。

$P_2$ は、アミンを介して導入されたマレイミド基を有するT101抗体。

(A) 適切な官能基が導入されたリシンA鎖の調製  
実施例1と同じ。

#### (B) 修飾抗体の調製

1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-カルボジイミド8.8mgとマレイミドカプロン酸11mgを含む溶液を、前もって25℃にて15分間インキュベートし、濃度10mg/mlのT101抗体溶液10ml(0.67マイクロモル)に加えた。その混合物を30℃にて3時間攪拌し、4℃にて40時間pH7の125mMリン酸緩衝液に対して連続的(5.00ml/時)透析した。この結果、1ml当り5.28mgの修飾抗体を含む

溶液18.5mlを得た。 $^{14}\text{C}$ -シテインによりマレイミド基を測定したところ、得られた抗体は1分子当り2.8個の活性基を有することが分かった。

#### (C) 免疫毒素の調製

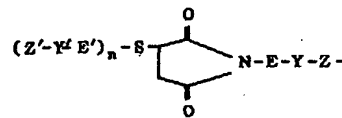
修飾されたリシンA鎖溶液7.5ml(0.44マイクロモル)を、上記で得られた活性型抗体の溶液3ml(0.11マイクロモル)に加えた。続いて、その混合物を30℃にて1時間静置した。残りのマレイミド基を5.8マイクロモルのシステインを添加して保護した。30℃にて1時間インキュベートした。この反応溶液を、実施例1に記載した方法通りセフザックスG100を詰めたカラム上でゲル濾過して精製した。この結果、濃度0.35mg/mlの免疫毒素溶液39ml(13.7mg)を得た。この溶液は、1ml当り抗体とカップリングした修飾A鎖(NEM)0.10mgを含んでいた。従って、この調製物のカップリングの程度は、抗体1分子当りA鎖(NEM)2.1であった。

この結果、前記Ⅱ式の免疫毒素が得られた。この式中で、

A'は、SH基がN-エチルマレイミドで保護されたリシンA鎖のラジカル。

P'は、T101抗体のラジカル。および、

Wは、次の式で示される原子団。



上式中、

- ・ Z'は-CO-
- ・ Y'は-NH-
- ・ E'は-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-
- ・ Eは-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-
- ・ Yは-CO-
- ・ Zは-NH-
- ・ nは1。

#### (D) 活性試験

a. テスト-1(無細胞系)：実施例1と同じ

じ。

b. テスト-2(有細胞系): 実施例1と同じ条件では、活性剤(10 mM塩化アンモニウム)存在下の $IC_{50}$ は $2 \times 10^{-11}$  モル/lであった。このことは、この包合体の細胞毒活性がA鎖のそれ(同じ実験で $IC_{50}$ は $5 \times 10^{-8}$ )より2,500倍高いことを示している。

### 実施例3

$P_1$ は、アミンを介して導入されたSH基を有するリシンA鎖。

$P_2$ は、アミンを介して導入された活性ジスルフィド基を有するT101抗体。

### (A) 適切な官能基が導入されたリシンA鎖の調製

1) N-エチルマレイミド保護: 実施例1に同じ。

#### 2) アミンの修飾

ジメチルホルムアミド(DMF)1 ml当たり8-アセチルノルカプトコハク酸(SAMSA)74 mgを含むDMF溶液50 mlを、pH7の125 mMリン酸緩衝液にA鎖(NEM)を溶かした溶液2.5 ml

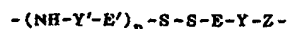
(1.7 mg)を得た。この溶液は、1 ml当たり抗体とカップリングした修飾A鎖(NEM)0.130 mgを含んでいた。従って、この調製物の平均のカップリングの程度は、抗体1分子当たりA鎖(NEM)1.1であった。

この結果、前記Ⅱ式の免疫毒素が得られた。この式中で、

A'は、SH基がN-エチルマレイミドで保護されたリシンA鎖のラジカル。

P'は、T101抗体のラジカル。および、

W'は、次の式で示される原子団



上式中、

・ Y'は -CO-

・ E'は  $\begin{array}{c} -CH- \\ | \\ CH_2COOH \end{array}$

・ Eは -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-

・ Yは -C-

・ Zは -NH-

・ nは 1。

(0.75 マイクロモル)に加えた。2時間インキュベートし、続いて過剰の試薬を除去するためにpH7の125 mMリン酸緩衝液に対して透析して精製した。この結果、濃度7.75 mg/mlの溶液2.6 mlを得た。ヒドロキシアミンとの反応により遊離したSH基を分光測定法で解析したところ、得られた修飾A鎖(NEM)は1分子当たり1.4個のSH基を有していることが分った。

### (B) 修飾抗体の調製

実施例1に同じ。

### (C) 免疫毒素の調製

修飾されたリシンA鎖溶液1.2 ml(0.81 マイクロモル)を、ヒドロキシアミン塩酸塩の1 M溶液350 ml存在下にて、上記で得られた活性型抗体の溶液2.3 ml(0.160 マイクロモル)に加えた。続いて、その混合物を30℃にて5時間インキュベートした。この反応溶液を、実施例1に記載した方法通りセファアックスG100を詰めたカラム上でゲル濾過して精製した。この結果、濃度0.71 mg/mlの免疫毒素溶液2.4 ml

### (D) 活性試験

#### a. テスト-1(無細胞系)

修飾されたA鎖の阻害活性を測定した。 $IC_{50}$ は $1.95 \times 10^{-10}$  モル/lであった。この実験で、対照のA鎖のICは $1.5 \times 10^{-10}$  モル/lであった。この結果から、修飾したからといってA鎖の活性が著しく減少するわけではなかった。

#### b. テスト-2(有細胞系)

実施例1と同じ条件では、活性剤(10 mM塩化アンモニウム)存在下の $IC_{50}$ は $1.6 \times 10^{-11}$  モル/lであった。このことは、この包合体の細胞毒活性がA鎖のそれ(同じ実験で $IC_{50}$ は $2.2 \times 10^{-8}$ )より4,000倍高いことを示している。モノクシジン(50 nM)存在下では、この免疫毒素の $IC_{50}$ は $10^{-15}$ であった。

### 実施例4

$P_1$ は、アミンを介して導入されたSH基を有するリシンA鎖。

$P_2$ は、アミンを介して導入されたマレイミド基を有するT101抗体。

## (A) 適切な官能基が導入されたリシンA鎖の調製

実施例3に同じ。

## (B) 修飾抗体の調製

実施例2に同じ。

## (C) 免疫毒素の調製

修飾されたリシンA鎖溶液 1.2 ml (0.31 マイクロモル) を、ヒドロキシアミン塩酸塩の 1 M 溶液 350  $\mu$ l 存在下にて、上記で得られた活性型抗体の溶液 3.5 ml (0.12 マイクロモル) に加えた。続いて、その混合物を 30℃ にて 1 時間インキュベートした。残りのマレイミド基を 6.9 マイクロモルのシステインを添加して保護した。30℃ にて 1 時間インキュベートした。この反応溶液を、実施例1に記載した方法通りセファックス G100 を詰めたカラム上でゲル濾過して精製した。この結果、濃度 0.51 mg/ml の免疫毒素溶液 30 ml (15.2 mg) を得た。この溶液は、1 ml 当り抗体とカップリングした修飾A鎖 (NEM) 0.08 mg を含んでいた。従って、この調製物の平均のカップリングの程度は、抗

体1分子当りA鎖 (NEM) 1 であった。

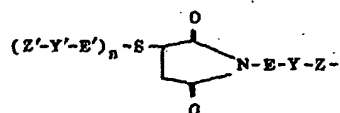
この結果、前記Ⅱ式の免疫毒素が得られた。

この式中で、

A' は、SH基がN-エチルマレイミドで保護されたリシンA鎖のラジカル。

P' は、T101抗体のラジカル。および、

W' は、次の式で示される原子団。



上式中、

- ・ Z' は -NH-
- ・ Y' は -CO-
- ・ E' は  $-\text{CH}-$   
          |  
          CH<sub>2</sub>COOH
- ・ E は  $-(\text{CH}_2)_6-$
- ・ Y は -CO-
- ・ Z は -NH-
- ・ n は 1。

## (D) 活性試験

## a. テスト-1 (無細胞系)

実施例3に同じ。

## b. テスト-2 (有細胞系)

実施例1と同じ条件では、活性剤 (50 nM モネンジン) 存在下の IC<sub>50</sub> は  $3.3 \times 10^{-12}$  モル/l であった。このことは、この包含体の細胞毒活性がA鎖のそれより 5,000 倍高いことを示している。

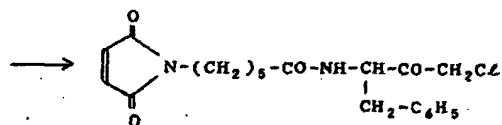
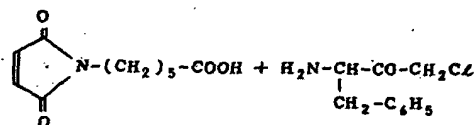
## 実施例5

P<sub>1</sub> は、アミンを介して導入されたSH基を有する抗DNP抗体。

P<sub>2</sub> は、アミンを介して導入されたマレイミド基を有するリシンのA鎖。

## (A) カップリング試薬の調製

カップリング試薬の調製は、マレイミドカプロン酸を2-フェニル-1-アミノエチルクロロメチルケトンで保護して実施した。



マレイミドカプロン酸 (1 当量) を、メチルクロロフォルメイト (1.1 当量) と N-エチルモルホリン (1.1 当量) 存在下にてテトラヒドロフラン (THF) に溶解した。この混合物を -30℃ にて 5 時間冷却した。冷THFに溶かした2-フェニル-1-アミノエチルクロロメチルケトンおよびN-エチルモルホリン (1.1 当量) を徐々に加えた。4℃ にて 1 時間静置して反応を進行させ、更に室温にて 3 時間反応を進行させた。続いて、反応溶液を濾過し、その濾液を真空中で蒸発乾固させた。残渣を酢酸エチルに再溶解させた。その有機層を水で2回抽

出し、 $MgSO_4$  上で乾燥し、蒸発乾固させた。結晶化しない生成物が得られるが、それをNMRスペクトル分析法により同定した。

(例) 適切な官能基が導入されたリシンA鎖の調製

1) N-エチルマレイミドによる保護

実施例1に同じ。

2) リシンA鎖のアミンの修飾

THFに溶解したカップリング試薬40マイクロモルを、8mg(0.26マイクロモル)のA鎖(NEM)をpH7の125mMリン酸緩衝液10mlに溶かした溶液に加えた。反応溶液を25℃にて5時間静置した。過剰の試薬を除くためにpH7の125mMリン酸緩衝液に対して透析して精製し、遠心した。 $^{14}C$ -システインによりマレイミド基を測定したところ、得られた修飾A鎖(NEM)は1分子当たり0.5個の活性基を有していることが分った。

(C) 修飾抗体の調製

DMFに濃度140mg/mlとなるように溶かしたSAMSAのDMF溶液20μlを、濃度10mg/mlの

T101抗体溶液4ml(0.3マイクロモル)に加えた。その混合物を4℃にて2時間攪拌し、続いて試薬を除くために24時間pH7の125mMリン酸緩衝液に対して連続的(400ml/時で20時間)に透析し、精製した。この結果、1ml当たり8.6mgの修飾抗体を含む溶液4.1mlを得た。ヒドロキシアミンによる反応後、エルマンの方法により遊離したSH基を分光測定法で解析したところ、得られた抗体は1分子当たり3.5個のSH基を有していることが分った。

(D) 免疫毒素の調製

修飾されたリシンA鎖溶液0.5ml(0.007マイクロモル)を、上記で得られた活性型抗体の溶液53μl(0.003マイクロモル)に加えた。ヒドロキシアミン塩酸塩の1.0M溶液10μlをこの反応溶液に加えた。25℃にて10時間静置して反応させた。濃度勾配ポリアクリルアミドゲル電気泳動により調べたところ免疫毒素が検出された。

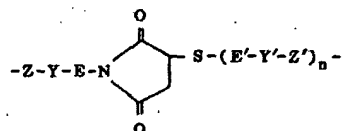
この結果、前記Ⅱ式の免疫毒素が得られた。

この式中で、

A'は、SH基がN-エチルマレイミドで保護されたリシンA鎖のラジカル。

P'は、抗DNP抗体のラジカル。および、

W'は、次の式で示される原子団。



上式中、

- ・ Zは-NH-
- ・ Yは-CO-
- ・ Eは-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-
- ・ E'は  $\begin{array}{c} \text{--CH--} \\ | \\ \text{CH}_2\text{COOH} \end{array}$
- ・ Y'は-CO-
- ・ Z'は-NH-
- ・ nは1。

(D) 活性試験

a. テスト-1(無細胞系)

修飾されたA鎖の阻害活性を測定した。IC<sub>50</sub>は $0.25 \times 10^{-10}$ モル/lであった。この実験で、対照のA鎖のIC<sub>50</sub>は $0.78 \times 10^{-10}$ モル/lであった。この結果から、修飾してもA鎖の活性は全く減少しなかった。

b. テスト-2(有細胞系)

実施例1と次の点以外同じ条件下で試験を実施した。フランス特許第78/27838号に記載の方法に従ってTNPで標識したCEM細胞を用いた。その方法は、ヒール細胞をTNPで標識する技法と類似している。活性剤(10mM塩化アンモニウム)存在下でのIC<sub>50</sub>は $1 \times 10^{-8}$ モル/lであった。この値は、A鎖のそれより10倍高かった。

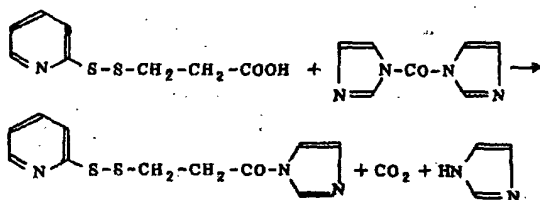
実施例6

P<sub>1</sub>は、アミンを介して導入されたSH基を有するT101抗体。

P<sub>2</sub>は、チロシンの水酸基を介して導入された活性型ジスルフィド基を有するリシンのA鎖。

## (A) カップリング試薬の調製

カップリング試薬には、3-(ピリジン2イル)スルホニル)プロピオン酸(PDPA)から誘導したイミダゾリドを用いた。このイミダゾリドはPDPAとカルボジイミダゾール(CDI)とから1工程で得られた。



PDPA 430 mgをTHF 2 mlに溶解した。CDI 405 mgをこの溶液に加えた。この混合物を、25℃にて15分間攪拌したところ炭酸ガスが発生した。この反応溶液を精製せずに直接かつ迅速に使用した。

## (B) 適切な官能基が導入されたリシンA鎖の調製

- 1) N-エチルマレイミドによる保護  
実施例1に同じ。

リン酸緩衝液に対して連続的(400 ml/時)透析し、精製した。この結果、1 ml当り8.6 mgの修飾抗体を含む溶液4.1 mlを得た。ヒドロキシアミン塩塩の0.5 M溶液0.64 mlをこの抗体溶液に加えた。30℃にて1時間インキュベーションしたのち、試薬を除くために24時間pH 7の125 mMリン酸緩衝液に対して透析し、精製した。エルマンの方法により遊離したSH基を分光測定法で解析したところ、得られた抗体は1分子当り5個の活性基を有していることが分かった。

## (D) 免疫毒素の調製

修飾されたリシンA鎖溶液5.2 ml(0.27マイクロモル)を、上記で得られた活性型抗体の溶液2.1 ml(0.11マイクロモル)に加えた。続いて、その混合物を30℃にて5時間インキュベーションした。この反応溶液を、実施例1に記載した方法通りセファデックスG100を詰めたカラム上でゲル濾過して精製した。この結果、濃度1.1 mg/mlの免疫毒素溶液17 ml

## 2) チロシンの 飾

THFに溶解したカップリング試薬300マイクロモルを、18 mg(0.6マイクロモル)のA鎖(NEM)をpH 7の125 mMのリン酸緩衝液10 mlに溶かした溶液に滴下した。反応溶液を25℃にて15分間攪拌した。過剰の試薬を除くためにpH 7の125 mMリン酸緩衝液に対して透析して精製した。この結果、タンパク濃度1.55 mg/mlの修飾A鎖溶液9.5 mlを得た。2-メルカプトエタノールとの交換反応により放出されるピリジン2-チオンを343 nmにて分光測定法で解析したところ、得られた修飾A鎖(NEM)は1分子当り1.6個の活性基を有していることが分かった。

## (C) 修飾抗体の調製

DMFに濃度170 mg/mlとなるように溶かしたSAMSAのDMF溶液25 mlを、濃度9 mg/mlのT101抗体溶液4.5 ml(0.3マイクロモル)に加えた。その混合物を4℃にて2時間攪拌し、続いて試薬を除くために24時間pH 7の125 mM

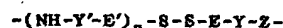
(18.7 mg)を得た。この溶液は、1 ml当り修飾されたA鎖(NEM)0.32 mgを含んでいた。従って、この調製物のカップリングの程度は、抗体1分子当りA鎖(NEM)2であった。

この結果、前記Ⅱ式の免疫毒素が得られた。この式中で、

A'は、SH基がN-エチルマレイミドで保護されたリシンA鎖のラジカル。

P'は、T101抗体のラジカル。および、

Wは、次の式で示される原子団。



上式中、

- ・ Y'は -CO-
- ・ E'は -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-
- ・ Eは  $\begin{array}{c} -CH- \\ | \\ CH_2COOH \end{array}$
- ・ Yは -CO-
- ・ Zは -O-
- ・ nは1。

## (B) 活性試験

## a. テスト-1 (無細胞系)

修飾されたA鎖の阻害活性を測定した。IC<sub>50</sub>は $3.6 \times 10^{-10}$ モル/lであった。この実験で、対照のA鎖のIC<sub>50</sub>は $1.2 \times 10^{-10}$ モル/lであった。この結果から、修飾してもA鎖の活性は全く減少しなかった。

## b. テスト-2 (有細胞系)

実施例2と同じ条件下で試験を実施した。活性剤(50 nM モネンジン)存在下でのIC<sub>50</sub>は $1.2 \times 10^{-12}$ モル/lであった。この値は、A鎖のそれ(IC<sub>50</sub>は $6 \times 10^{-8}$ モル/l)より $5 \times 10^4$ 倍高かった。

## 実施例7

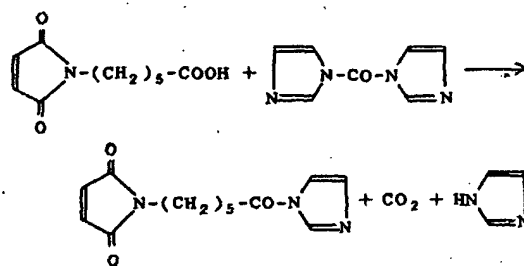
P<sub>1</sub>は、アミンを介して導入されたSH基を有するT101抗体。

P<sub>2</sub>は、チロシンの水酸基を介して導入された活性型マレイミド基を有するリシンのA鎖。

## (A) カップリング試薬の調製

カップリング試薬にはマレイミドカプロン酸

から誘導したイミダゾリドを用いた。このイミダゾリドはマレイミドカプロン酸とカルボジイミドから1工程で得られた。



マレイミドカプロン酸422mgをTHF 2mlに溶解した。CDI 405mgをこの溶液に加えた。この混合物を、室温にて15分間攪拌したところ炭酸ガスが発生した。この反応溶液を精製せずに直接に使用した。

## (B) 適切な官能基が導入されたりシンA鎖の調製

## 1) N-エチルマレイミドによる保護

実施例1に同じ。

## 2) チロシンの修飾

THFに溶解したカップリング試薬300マイクロモルを、18mg(0.6マイクロモル)のA鎖(NEM)をpH7の125mMのリン酸緩衝液1.0mlに溶かした溶液に滴下した。反応溶液を25℃にて15分間攪拌した。過剰の試薬を除くためにpH7の125mMリン酸緩衝液に対して透析して精製した。この結果、タンパク濃度1.45mg/mlの修飾A鎖溶液20mlを得た。C-ジステインによるマレイミド基を測定したところ、得られた修飾A鎖(NEM)は1分子当たり1個の活性基を有していることが分った。

## (C) 修飾抗体の調製

実施例6に同じ。

## (D) 免疫毒素の調製

修飾されたりシンA鎖溶液5.8ml(0.28マイクロモル)を、上記で得られた活性型抗体の溶液2.1ml(0.11マイクロモル)に加えた。続いて、その混合物を30℃にて1時間インキュベーションした。残ったマレイミド基を5マ

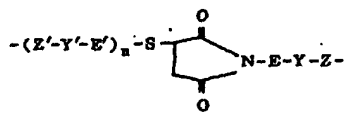
イクロモルのジステインで保護した。30℃にて1時間インキュベーションし、この反応混合物を、実施例1に記載した方法通りセファデックスG100を詰めたカラム上でゲル濾過して精製した。この結果、濃度1.05mg/mlの免疫毒素溶液19.5ml(20.5mg)を得た。この溶液は、1ml当り修飾されたA鎖(NEM)0.31mgを含んでいた。従って、この調製物のカップリングの程度は、抗体1分子当りA鎖(NEM)2であった。

この結果、前記Ⅱ式の免疫毒素が得られた。この式中で、

A'は、SH基がN-エチルマレイミドで保護されたりシンA鎖のラジカル。

P'は、T101抗体のラジカル。および、

Wは、次の式で示される原子団。



上式中、

- ・ Z'は -NH-
- ・ Y'は -CO-
- ・ E'は  $\begin{array}{c} \text{-CH-} \\ | \\ \text{CH}_2\text{COOH} \end{array}$
- ・ Eは  $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
- ・ Yは -CO-
- ・ Zは -O-
- ・ nは 1。

#### (例) 活性試験

##### a. テスト-1 (無細胞系)

修飾されたA鎖の阻害活性を測定した。IC<sub>50</sub>は  $10 \times 10^{-10}$  モル/ℓであった。この実験で、対照のA鎖のIC<sub>50</sub>は  $1.1 \times 10^{-10}$  モル/ℓであった。活性がかなり消失しているものの、修飾A鎖のタンパク合成阻害能はまだ高かった。

##### b. テスト-2 (有細胞系)

実施例1と同じ条件下で試験を実施した。活性剤(500 nM モネンジン)存在下でのIC<sub>50</sub>は  $3 \times 10^{-11}$  モル/ℓであった。この値は、A鎖

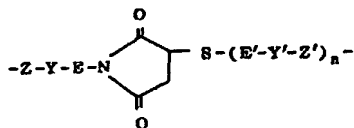
に記載した方法通りセファデックスG100を詰めたカラム上でゲル濾過して精製した。この結果、濃度1 mg/mlの溶液90 ml(20.5 mg)を得た。この溶液は、1 ml当り修飾されたA鎖(NEM)0.27 mgを含んでいた。従って、この調製物のカップリングの程度は、抗体1分子当りA鎖(NEM)1.8であった。

この結果、前記Ⅲ式の免疫毒素が得られた。この式中で、

A'は、リシンA鎖のラジカル。

P'は、AT15E抗体のラジカル。および、

Wは、次の式で示される原子団。



上式中、

- ・ Zは -NH-
- ・ Yは -CO-
- ・ Eは  $\text{-(CH}_2\text{)}_5\text{-}$

のそれ(IC<sub>50</sub>は  $6 \times 10^{-8}$  モル/ℓ)より  $3 \times 10^5$  倍高かった。

#### 実施例8

P<sub>1</sub>は、天然状態のリシンA鎖。

P<sub>2</sub>は、アミンを介して導入されたマレイミド基を有するAT15E抗体。

#### (A) 修飾抗体の調製

実施例2に記載の方法によりAT15E抗体を修飾した。<sup>14</sup>C-システインにより測定したところ、抗体1分子当り2.4個のマレイミド基が導入されていた。

#### (B) 免疫毒素の調製

pH7の125 mMリン酸緩衝液にリシンA鎖を溶かした溶液8.3 ml(0.2 マイクロモル)を、上記で得られた活性型抗体の溶液25 ml(0.65 マイクロモル)に加えた。続いて、その混合物を30℃にて1時間インキュベーションした。残ったマレイミド基を9.25 マイクロモルのシステインで保護した。30℃にて1時間インキュベーションし、この反応混合物を、実施例1

・ nはゼロ

・ mは 1.8。

#### (C) 活性試験

##### テスト-2 (有細胞系)

このテストは、Thy 1.2抗原を有するマウスT細胞白血病の細胞を用いた以外は実施例1と同じ条件下で実施した。活性剤(50 nM モネンジン)存在下でのIC<sub>50</sub>は  $10^{-9}$  モル/ℓであった。この値は、A鎖のそれ(IC<sub>50</sub>は  $5 \times 10^{-7}$  モル/ℓ)より500倍高かった。

#### 実施例9

P<sub>1</sub>は、天然状態のリシンA鎖。

P<sub>2</sub>は、チロシンの水酸基を介して導入された活性型ジスルフィド基を有するT101抗体。

#### (A) カップリング試薬の調製

実施例6に同じ

#### (B) 修飾抗体の調製

2倍希釈した前記THF溶液3.4 μℓ(IgG濃度は20.0 当量/モル)を、T101抗体12.8 mgを1.8 mlのpH7の125 mMリン酸緩衝液に溶

かした溶液に滴下した。この反応溶液を室温にて15分間攪拌し、続いて透析により精製したところ、濃度4.55mg/mlの修飾抗体の溶液2.6mlを得た。2-メルカプトエタノールとの交換反応により放出されたピリジン2-チオンを343nmで分光測定法により解析したところ、得られた抗体は1分子当たり2.2個の活性基を有していることが分った。

#### (C) 免疫毒素の調製

濃度4.55mg/mlの活性型抗体の溶液2.5ml(0.075マイクロモル)を、濃度7.1mg/mlのリシンA鎖の溶液750μl(0.177マイクロモル)に加えた。続いて、その混合物を25℃にて18時間インキュベーションした。この反応混合物を、実施例1に記載した方法通りセファックスG100を詰めたカラム上でゲル濾過して精製した。この結果、濃度0.8mg/mlの溶液1.3ml(10.4μg)を得た。この溶液は、1ml当たりA鎖(NEM)0.2μgを含んでいた。従って、この調製物のカップリングの程度は、抗体

モル/l)より $1.5 \times 10^5$ 倍高かった。

#### 実施例10

P<sub>1</sub>は、天然状態のリシンA鎖。

P<sub>2</sub>は、チロシンの水酸基を介して導入されたマレイミド基を有するT101抗体。

#### (A) カップリング試薬の調製

実施例7に同じ。

#### (B) 修飾抗体の調製

2倍希釈した前記THF溶液34μl(Ig濃度は200当量/モル)を、T101抗体12.8μgを1.8mlのpH7の125mMリン酸緩衝液に溶かした溶液に滴下した。この反応溶液を室温にて15分間攪拌し、続いて透析により精製したところ、濃度4.5mg/mlの修飾抗体の溶液2.6mlを得た。<sup>14</sup>C-システインによるマレイミド基を測定したところ、得られた抗体は1分子当たり4個の活性基を有していることが分った。

#### (C) 免疫毒素の調製

濃度4.5mg/mlの活性型抗体の溶液2.5ml(0.075マイクロモル)を、濃度7.1mg/mlの

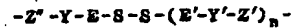
1分子当たりA鎖(NEM)1.5であった。

この結果、前記Ⅲ式の免疫毒素が得られた。この式中で、

A'は、リシンA鎖のラジカル。

P'は、T101抗体のラジカル。および、

Wは、次の式で示される原子団。



上式中、

・ Z'は-O-

・ Yは-CO-

・ Eは-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-

・ nは正の整数；

・ mは1.5。

#### (D) 活性試験

テスト-2(有細胞系)

実施例1と同じ条件下で試験を実施した。活性剤(50nMモノンジン)存在下でのIC<sub>50</sub>は $3.5 \times 10^{-13}$ モル/lであった。この値は、その細胞毒性がA鎖のそれ(IC<sub>50</sub>は $0.6 \times 10^{-8}$

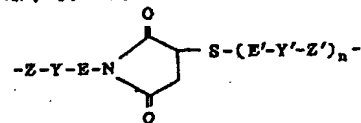
リシンA鎖の溶液850μl(0.20マイクロモル)に加えた。続いて、その混合物を25℃にて1時間インキュベーションした。残ったマレイミド基を6マイクロモルのシステインで保護した。この反応混合物を、実施例1に記載した方法通りセファックスG100を詰めたカラム上でゲル濾過して精製した。この結果、濃度0.76mg/mlの免疫毒素溶液1.1ml(10.4μg)を得た。この溶液は、1ml当たりA鎖(NEM)0.29μgを含んでいた。従って、この調製物の平均のカップリングの程度は、抗体1分子当たりA鎖(NEM)3であった。

この結果、前記Ⅲ式の免疫毒素が得られた。この式中で、

A'は、リシンA鎖のラジカル。

P'は、T101抗体のラジカル。および、

Wは、次の式で示される原子団。





上式中、

・ Z は -O-

・ Y は -CO-

・ E は  $-(CH_2)_5-$

・ n は ぜ ろ ;

・ m は 3。

④ 活性試験

テスト - 2 (有細胞系)

このテストは、実施例 1 と同じ条件下で実施した。活性剤 (50 nM モネンジン) 存在下での  $IC_{50}$  は  $1.7 \times 10^{-12}$  モル/l であった。この値は、同実験において A 鎖のそれより  $3 \times 10^5$  倍高かった。

出願人代理人 弁理士 鈴 江 武 彦